

重金属镉、锌在菹草叶细胞中的超微定位观察*

徐勤松, 施国新, 杜开和

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

Ultrastructural Localization Observation of Cd and Zn in
Leaf Cells of *Potamogeton crispus*

XU Qin-Song, SHI Guo-Xin, DU Kai-He

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The ultrastructural localization of Cd and Zn in leaf cells of *Potamogeton crispus* Linn. was studied with modified sulfide-silver method. Observation showed that Cd and Zn appeared in cell wall, cell membrane and tonoplast. Silver grains were also observed in chloroplast and certain vacuoles. The toxic mechanism of heavy metals was discussed based on the experimental results.

Key words: Cd; Zn; *Potamogeton crispus*

关键词: 镉; 锌; 菹草

中图分类号: Q 944 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2002)02-0241-04

水环境污染中十分突出的是重金属的污染, 主要来源为流入物、渗漏和大气沉降 (Larcher, 1995)。由于重金属污染物不但不能被微生物所分解, 而且能在生物体内富集, 并通过水生食物链的生物放大作用而对高营养级的生物甚至人类造成危害, 因此日益引起人们的特别关注。许多研究从超微结构损伤和生理生化的角度研究了重金属对植物的毒害机制。施国新等 (2000) 观察了重金属汞、镉污染对水生植物黑藻叶细胞的超微结构损伤。彭鸣等 (1991) 研究了重金属镉、铅诱导的玉米超微结构的变化。李荣春 (2000) 研究了 Cd、Pb 及其复合污染对烤烟叶片生理生化及细胞亚显微结构的影响。我们 (2001) 分析了重金属 Cd、Cr (VI) 复合污染对菹草叶绿素含量和抗氧化酶系统的影响情况。Hans 等 (1980) 采用亚细胞组分离技术分析了 Cd 在生长 12 d 的大豆叶片和根系中的分布情况。而应用细胞化学的方法研究重金属在植物体内的分布规律, 目前国内外尚未见报道。本实验采用重金属的硫化物-银法, 对重金属 Cd、Zn 在菹草叶细胞中的分布进行初步超微结构定位观察。旨在为进一步探讨重金属对植物的损伤机制和耐性机制提供有益的资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

菹草 [*Potamogeton crispus* Linn.] 采自江苏省高邮湖和南京师范大学生命科学学院水生植物培育池,

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (39770046)

收稿日期: 2001-05-21, 2001-08-27 接受发表

作者简介: 徐勤松 (1976-) 男, 山东人, 在读博士生, 主要研究重金属对水生高等维管束植物的毒害机制。

在 FORMA 生化培养箱 (USA) 中培养, 温度为 25℃, 光照时间为每天 12 h。生长正常后, 一次性施入 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (AR) 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CP), 使培养液中 Cd [以纯 Cd 计] 和 Zn 的浓度分别为 8 mg/L 和 25 mg/L, 培养第 7 d 取相同部位的叶片进行电镜观察。

1.2 实验方法

重金属的硫化物-银法: 切片先在含有饱和 H_2S 的 2.5% 戊二醛固定液中固定, 然后在不含 H_2S 的新鲜戊二醛固定液中继续固定, 用冷的 0.1 mol/L Tris-maleate 缓冲液清洗, 乙醇脱水, 常规电镜包埋, 切片捞到 Formvar 膜的不锈钢网上, 物理显影液中显影, 显影液贮存液成分为: Dextran 80 (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden), 蔗糖和柠檬酸, 再将 17 mg 氢醌溶于 10 mL 上述贮存液中, 柠檬酸调 pH 值, 最后加 0.09 mL 10% 硝酸银溶液, 蒸馏水漂洗, 干燥后于 Hitachi 600-A-2 型透射电镜下观察并拍照。对照为用不含重金属的培养液中培养的植株, 样品处理方法同上。

2 观察结果

2.1 Cd 在叶细胞中的分布

与对照 (图版 I: 3) 相比, Cd 在细胞壁上大量存在, 均匀分布 (图版 I: 6)。在叶绿体 (图版 I: 2) 和一些囊泡和细胞质也有分布 (图版 I: 6)。

2.2 Zn 在叶细胞中的分布

电镜下观察发现 Zn 离子在细胞壁有较多的分布 (图版 I: 1, 5)。在向内凹陷的细胞膜上有大量的颗粒 (图版 I: 5)。细胞质中也有许多银颗粒存在 (图版 I: 5), 叶绿体上也有分布。在细胞中一些囊泡状结构上的颗粒较其它更明显 (图版 I: 4)。

3 讨论

大量的研究成果表明, 重金属对植物细胞的各种细胞器均能造成不可逆的损伤, 从而导致植物细胞的死亡 (施国新等, 2000; 彭鸣等, 1991; 李荣春, 2000)。但由于重金属颗粒微小而分散, 在体内的浓度比较低, 常规电镜制片方法不能显示出它们在细胞中的分布。重金属的硫化物-银法的基本原理就是用 H_2S 处理组织, 使之形成不溶性的重金属硫化物, 然后再用银增强的方法证实重金属的存在部位, 此方法已在动物组织的重金属定位中得到广泛应用, 并且认为有相当的灵敏度和特异性 (Phil, 1967)。由于 Cd、Zn 是流动性比较强的离子, 因此, 在电镜下观察时发现植物细胞的细胞壁、质膜和液泡膜以及部分细胞器和细胞质中都有分布, 这也是它们对植物毒害作用较强的原因。细胞壁具有很强的积累阳离子的能力, 是重金属进入细胞的第一道屏障 (Poulter 等, 1985)。在细胞壁的果胶质成分为结合重金属离子提供了大量的离子交换点 (Peterson, 1969)。Nishizono (1987) 分析蹄盖蕨属 (*Athyrium yokoscense*) 的根细胞壁在重金属耐受性中的作用时, 发现该植物吸收的 Cd、Zn 总量的大约 70% ~ 90% 位于细胞壁, 大部分以离子形式存在或结合到细胞壁结构物质, 如纤维素、木质素上。我们的观察结果表明叶细胞壁也是重要的离子贮存场所。因此, 可以认为细胞壁的金属沉淀作用对植物对重金属的耐受性起一定作用。同时, 离子大量存在于细胞壁上也为重金属导致细胞壁边缘的壁物质松散现象 (施国新等, 2000) 提供了更直接的证据。当重金属与细胞壁结合达到饱和后, 多余的重金属离子便进入原生质从而导致对细胞的毒害。电镜观察结果表明 Cd、Zn 在细胞内主要存在于膜性结构上, 这与重金属离子主要破坏细胞的膜性结构相吻合, 其机制可能是由于重金属离子主要与膜蛋白相结合, 使蛋白质变性, 从而使以蛋白质为主要成分的膜结构改变, 导致功能丧失 (李荣春, 2000)。

〔参 考 文 献〕

Hans JW , Hans JJ , 1980. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants[J]. *Plant Physiol* , **65** : 480—482

Larcher W , 1995. *Physiological Plant Ecology*[M](3rd ed.). New York : Springer-Verlag , 321

Li RC (李荣春) , 2000. Effects of cadmium and lead on physiological and ultra-structural features in tobacco leaves[J]. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报) , **24** (2) : 238—242

Nishizono H , 1987. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* [J]. *Plant and Soil* , **101** : 15—20

Peng M (彭鸣) , Wang HX (王焕校) , Wu YS (吴玉树) , 1991. Ultra structural changes induced by cadmium and lead in corn seedling cell[J]. *China Environmental Science* (中国环境科学) , **11** (6) : 426—431

Peterson PJ , 1969. The distribution of Zinc-65 in *Agrostis tenuis* and *A. stolonifera* L. tissue[J]. *J Experi Bot* , **20** : 863—875

Phil E , 1967. Ultra structural localization of heavy metals by a modified sulfide-silver method[J]. *Histochemie* , **10** : 126—139

Poulter A , Collin HA , Thurman DA , *et al* , 1985. The role of cell wall in the mechanism of lead and zinc tolerance in *Anthoxanthum odoratum* L[J]. *Plant Sci* , **42** : 61—66

Shi GX (施国新) , Du KH (杜开和) , Xie KB (解凯彬) *et al* , 2000. Ultra structural study of leaf cells damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in *Hydrilla verticillata* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报) , **42** (4) : 373—378

Xu QS (徐勤松) , Shi GX (施国新) , Hao HQ (郝怀庆) , 2001. Effects of Cd、Cr (VI) single and combined pollution on chlorophyll content and antioxidant enzyme systems of *Potamogeton crispus* Linn[J]. *Guihaia* (广西植物) , **21** (1) : 87—90

图版说明

CP. 叶绿体 ; CW. 细胞壁 ; V. 囊泡 ; VM. 液泡膜

图版 I 1. 25 mg/L Zn 处理的叶细胞 , 示液泡膜和细胞壁上的金属颗粒 (× 15 000); 2. 8 mg/L Cd 处理的叶细胞 , 示液泡膜和叶绿体上的金属颗粒 (× 15 000); 3. 对照叶细胞的超微结构 , 示无金属颗粒 (× 15 000); 4. 25 mg/L Zn 处理的叶细胞 , 示细胞壁和囊泡上的金属颗粒 (× 15 000); 5. 25 mg/L Zn 处理的叶细胞 , 示细胞壁和细胞膜上的金属颗粒 (× 15 000); 6. 8 mg/L Cd 处理的叶细胞 , 示分布在细胞壁和囊泡中的金属颗粒 (× 15 000);

Explanation of plates

CP : Chloroplast ; CW : Cell Wall ; V : Vacuole ; VM : Vacuole membrane

Plate I 1. Leaf cells treated with 25 mg/L Zn , showing scattered silver precipitates localized to the cell wall and vacuole membrane (× 15 000); 2. Leaf cells treated with 8 mg/L Cd , showing silver deposits in chloroplast and vacuole membrane (× 15 000); 3. Ultra structure of control leaf cells , no silver particle in existence (× 15 000); 4. Leaf cells treated with 25 mg/L Zn , showing silver deposits in cell wall and vacuole (× 15 000); 5. Leaf cells treated with 25 mg/L Zn , showing silver deposits in cell wall and cell membrane (× 15 000); 6. Leaf cells treated with 8 mg/L Cd , showing silver deposits in cell wall and vacuole (× 15 000)

